

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 mai 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/41928 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61L 27/34, 27/14, 27/56, 27/54

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 6, Avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03623

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
19 novembre 2001 (19.11.2001)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt :
français

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(26) Langue de publication :
français

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(30) Données relatives à la priorité :
00/15065 22 novembre 2000 (22.11.2000) FR



(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS [FR/FR]; 3, Avenue Victoria, F-75004 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOUDY, Vincent [FR/FR]; 9, rue du Jura, F-75013 PARIS (FR). LAURENT, Alexandre [FR/FR]; 3, Parc Delattre de Tassigny, F-92400 COURBEVOIE (FR). LABARRE, Denis [FR/FR]; 44, rue des Quatres Cantons, F-91140 VILLEBON (FR). CHAUMEIL, Jean-Claude [FR/FR]; 57, rue des Chênes Verts, F-91240 ST-MICHEL SUR ORGE (FR).

WO 02/41928 A1

(54) Title: POROUS POLYMERIC BIOMATERIALS, PREPARATION METHOD AND USES

(54) Titre : BIOMATERIAUX POLYMERES POREUX, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns porous polymeric biomaterials containing a porous polymeric matrix optionally filled with biological and/or chemical active agents, the method for preparing same and their uses, in particular as implant.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à des biomatériaux polymères poreux renfermant une matrice polymère poreuse éventuellement chargée en actifs biologiques et/ou chimiques, leur procédé de préparation ainsi que leurs utilisations, notamment à titre d'implant.

BIOMATÉRIAUX POLYMIÈRES POREUX, PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention est relative à des biomatériaux polymères poreux renfermant une matrice polymère poreuse éventuellement chargée en actifs biologiques et/ou chimiques, leur procédé de préparation ainsi que leurs utilisations, notamment à titre d'implant.

L'utilisation de biomatériaux résorbables ou non résorbables, est fréquente dans le milieu médical. Ces biomatériaux peuvent se présenter sous diverses formes et être utilisés par exemple pour la réalisation d'occlusions vasculaires thérapeutiques (embolisations), pour la reconstruction cellulaire, le traitement du reflux gastro-œsophagien, de l'incontinence urinaire ou bien encore pour la réduction des rides.

C'est ainsi, que pour la réalisation d'occlusions vasculaires thérapeutiques il a déjà été proposé, notamment dans la demande de brevet FR-A-2 676 927, l'utilisation de microbilles composées d'un copolymère acrylique hydrophile recouvert d'un agent promoteur de l'adhésion cellulaire tel que par exemple le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycanes, la fibronectine, les lectines, etc. Le copolymère acrylique composant ces microbilles renferme de préférence un ou plusieurs monomères portant une charge cationique, de façon à initier et améliorer l'adhésion cellulaire sur les microbilles au niveau du site d'embolisation. Par ailleurs, lors de la synthèse de ces microbilles, et afin d'en augmenter la stabilité, un agent réticulant peut être ajouté pour réticuler l'agent d'adhésion recouvrant les microsphères.

Toujours pour la réalisation d'embolisations, il a également été proposé, notamment dans la demande de brevet FR-A-2 784 580, des microsphères comprenant de l'alcool polyvinyle réticulé, lesdites microsphères pouvant également comprendre un agent promoteur de l'adhésion cellulaire et être éventuellement imprégnées par un principe actif tel qu'un agent anti-angiogène ou anti-inflammatoire. Cependant, avec ce type de microsphères, il n'est pas possible de contrôler la libération du principe actif incorporé, c'est-à-dire la libération retardée ou prolongée de celui-ci.

D'autre part, la demande internationale WO 99/44643 décrit une méthode de traitement du reflux gastro-œsophagien dans laquelle sont utilisées des microparticules hydrophiles cationiques biocompatibles comprenant un agent promoteur de l'adhésion cellulaire et éventuellement un principe actif portant une charge anionique capable de se lier de façon covalente aux dites microparticules cationiques. Cependant, l'utilisation de ce type de microparticules est limitée à l'incorporation de principes actifs présentant une charge anionique et ne permet pas non plus de contrôler leur libération.

Enfin, il a également déjà été proposé d'enrober des microsphères d'embolisation cationiques sur lesquelles était greffé un principe actif anionique (indométacine), l'enrobage de ces microsphères étant réalisé au moyen d'un polymère d'enrobage tel que l'éthylcellulose (Boudy *et al.*, J. Pharm. Clin., 1999, 18, 21-23).

Cependant, cette technique entraîne une modification des propriétés physico-chimiques des microsphères (forme, propriétés mécaniques, surface d'échange entre le biomatériau et le milieu biologique, etc) et ne permet pas d'aboutir à une libération contrôlée du principe actif, l'enrobage n'ayant pas d'action significative sur la cinétique de libération de celui-ci.

Or le problème du contrôle de la libération d'actifs biologiques et/ou chimiques à partir d'un biomatériau est fondamental, dans la mesure où ces actifs doivent pouvoir être retenus par le biomatériau pendant un temps adapté à l'implantation dudit matériau sur le site où la libération subséquente du principe actif est envisagée.

Par exemple, dans le cadre de la réalisation d'embolisations au moyen de microsphères, le principe actif, qui peut notamment être un agent anti-inflammatoire, doit pouvoir rester dans les microsphères pendant toute la durée de préparation de la solution injectable contenant les microsphères et qui servira à réaliser l'embolisation, puis pendant l'acheminement de ces microsphères par la circulation sanguine jusqu'au site d'embolisation où il sera finalement libéré (cette durée étant environ de 2 à 10 minutes).

C'est afin de remédier à ces problèmes que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de l'invention.

Les Inventeurs se sont donc fixés pour objectif de pourvoir à un biomatériau permettant la libération contrôlée (en temps et en quantité) d'un ou plusieurs actifs biologiques et/ou chimiques.

La présente invention a donc pour objet un biomatériau poreux caractérisé en ce qu'il est constitué d'un réseau polymère poreux hydrophile ou amphiphile (réseau support) dont les pores renferment un réseau polymère poreux gélifié (réseau de remplissage), et dans lequel le diamètre des pores du réseau support est supérieur au diamètre des pores du réseau de remplissage.

Les Inventeurs ont en effet démontré que la présence d'un réseau de remplissage tel que défini ci-dessus (dans lequel sera contenu l'actif biologique et/ou chimique) au sein d'un réseau support permet de contrôler la libération (libération retardée ou prolongée) dudit actif, sans pour autant modifier les caractéristiques physico-chimique du réseau support (forme, propriétés mécaniques, surface d'échange entre le biomatériau et le milieu biologique, etc).

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'invention, la dureté du réseau support est supérieure à la dureté du réseau de remplissage, du fait que le réseau support a une solidité assurée par des liaisons covalentes, tandis que le réseau de remplissage a une solidité assurée par interaction ionique.

Selon l'invention, le réseau support peut être constitué par un ou plusieurs polymères résorbables ou non résorbables.

Parmi les polymères utilisables à titre de réseau support, on peut notamment citer les polyepsilons caprolactones, les polymères et copolymères d'acide lactique et glycolique, l'albumine, la caséine, les gélatines réticulées, les polyanhydrides, les esters et éthers de cellulose, les polymères acryliques et méthacryliques tels que les acrylates et les méthacrylates tels que par exemple le polyhydroxyéthylméthacrylate et ses dérivés, les polyacrylamides substitués ou non tels que le poly-(N-acryloyl-2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) et ses dérivés (TRISACRYL ®), le poly-(n-2-hydroxypropyl méthacrylamide) et ses dérivés, les poly (alcools vinyliques) et les polyuréthanes

Parmi les polymères acryliques on peut tout particulièrement citer les polymères formés à partir de copolymères acryliques modifiés ou non par des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables tels que des groupements

(C₁-C₄)alkylamino et (C₁-C₄)alkylamino(C₁-C₄)alkyle tels que par exemple le groupement diéthylaminoéthyle (DEAE).

De façon préférentielle, le réseau support du biomatériau conforme à l'invention est une microsphère poreuse formée de copolymères acryliques modifiés 5 par des groupements DEAE. De telles microsphères sont par exemple vendues sous la dénomination commerciale DEAE-TRISACRYL ® par la société BIOSEPRA.

Selon l'invention, le réseau de remplissage peut être constitué par un ou plusieurs polymères résorbables ou non.

10 Parmi les polymères utilisables à titre de réseau de remplissage, on peut notamment citer les alginates, les pectines, l'acide hyaluronique, les carraghénanes, l'agarose, les agaropectines, les amyloses, les amyopectines, les arabino-galactanes, la cellulose et ses dérivés tels que par exemple la méthylcellulose et l'éthylcellulose, le chitosane, la gomme adragante, la gomme arabique, la gomme de guar, les xanthanes, les dextrans, le collagène et les gélatines.

15 De façon astucieuse et selon une forme de réalisation particulière de l'invention, la nature des polymères utilisables à titre de réseau de remplissage peut être choisie spécifiquement en fonction de la nature des enzymes éventuellement présentes sur le site d'implantation du biomatériau, afin que celles-ci dégradent le réseau de remplissage afin d'en libérer l'actif.

20 A titre d'exemple, les polymères du réseau de remplissage peuvent donc également être choisis parmi les polymères à liaison azoïque qui seront dégradés par des azoréductases d'origine bactérienne, les polymères glucosidiques qui seront dégradés par des glucosidases digestives, les polymères mixtes acryliques-azoïques ou acryliques-glucosidiques ou encore des polymères comportant des liaisons esters qui 25 seront dégradés par des estérases digestives.

Selon une forme de réalisation préférée de l'invention, le réseau de remplissage se présente sous la forme d'un gel d'alginate.

Les alginates sont composés d'enchaînements linéaires d'homopolysaccharides composés d'unités α -1,4-D-guluronane et d'unités β -1,4-D-mannuronane et d'enchaînements linéaires d'hétéropolysaccharides composés d'unités liées en positions 1,4 d'acides α -L-guluronique et β -D-mannuronique (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1998, 25, 34-40).

Les propriétés des alginates sont essentiellement déterminées par leur masse moléculaire ainsi que par les proportions respectives des différentes unités saccharidiques les composant, ces proportions variant en fonction de l'espèce d'algues brunes dont ils sont extraits. Les gels les plus durs sont obtenus à partir d'alginates renfermant une forte proportion d'unités acide α -L-guluronique.

5 Selon l'invention, on préfère utiliser des alginates comprenant de 30 % à 75 % d'unités acide α -L-guluronique.

Parmi ces gels d'alginate utilisables à titre de réseau de remplissage, on peut notamment citer les gels d'alginate de sodium de haute viscosité tels que ceux vendus sous les dénominations MANUGEL ® DJX, MANUGEL ® DMB et KELTONE ® HVCR par la société MONSANTO.

Ainsi que cela a été indiqué précédemment, le diamètre des pores du réseau support est supérieure au diamètre des pores du réseau de remplissage.

15 Le diamètre des pores du réseau de remplissage est de préférence tel qu'il permet la diffusion de molécules dont la masse moléculaire varie entre 10 daltons (Da) et 10^6 Da environ et encore plus particulièrement entre 10^2 et 10^4 Da.

Selon une forme de réalisation préférée de l'invention, le réseau de remplissage du biomatériau renferme au moins un actif biologique et/ou chimique.

La nature du ou des actifs biologiques et/ou chimiques pouvant être 20 renfermés dans les pores du réseau de remplissage variera en fonction des applications envisagées et de la taille des pores du réseau de remplissage.

A titre d'exemple, on peut notamment citer les agents anti-inflammatoires, les agents angiogéniques, les anti-mitotiques, les inhibiteurs de l'angiogénèse, les facteurs de croissance, les vitamines, les hormones, les protéines, 25 les vaccins, les peptides, les antiseptiques, les antimicrobiens tels que les antibiotiques, et de manière générale tout agent à visée thérapeutique, préventive ou diagnostique.

Le biomatériau conforme à l'invention peut se présenter sous diverses formes en fonction des applications envisagées. Il peut notamment se 30 présenter sous la forme de film, de bloc, de feuille, de tige, de fil, de particule telle que par exemple de microsphère, ou sous toute autre forme adaptée à son utilisation dans le domaine biomédical, en particulier comme implant.

Selon une forme de réalisation particulièrement avantageuse de l'invention, le biomatériau conforme à l'invention est une microsphère poreuse constituée de copolymères acryliques modifiés ou non par des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables choisis parmi les groupements (C₁-C₄)alkylamino et (C₁-C₄)alkylamino(C₁-C₄)alkyle, les pores de ladite microsphère étant remplis d'un gel d'alginate poreux dont les pores renferment au moins un actif biologique et/ou chimique.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un tel biomatériau tel que défini précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les 10 étapes suivantes :

- a) l'imprégnation d'au moins un polymère poreux hydrophile ou amphiphile (réseau support) par une solution aqueuse (A) d'au moins un polymère de remplissage à l'état liquide,
- b) l'imprégnation dudit polymère poreux hydrophile ou amphiphile 15 par une solution aqueuse (B) d'au moins un agent apte à faire passer ledit polymère de remplissage de l'état liquide à l'état gélifié, et éventuellement
- c) l'imprégnation dudit polymère poreux hydrophile ou amphiphile par une composition (C) contenant au moins un actif biologique et/ou chimique, ladite imprégnation pouvant être effectuée de façon concomitante aux étapes a) et b) par 20 addition de la composition (C) dans l'une et/ou l'autre des solutions (A) et (B) ou de façon séparée après les étapes a) et b).

Selon une forme de réalisation avantageuse du procédé conforme à l'invention, le réseau support est, dans une première étape, imprégné au moyen d'une solution (A) telle que définie ci-dessus, puis dans une deuxième étape, par une 25 solution (B) telle que définie également ci-dessus, la composition (C) étant ajoutée à la solution (A) et/ou (B).

La concentration en polymère de remplissage dans la solution (A) varie de préférence de 0,01 à 2 % en poids par rapport au poids total de la solution (A) ; cette concentration pouvant être progressivement augmentée pendant la durée de 30 réalisation de l'opération a).

Selon ce procédé, le polymère de remplissage est de préférence choisi parmi le collagène, les gélatines et les polysaccharides tels que les alginates, les pectines, les dextrans, et les carraghénanes.

La nature de l'agent apte à faire passer le polymère de remplissage d'un état liquide à un état gélifié (agent de gélification) est bien entendu fonction de la nature du polymère de remplissage.

A titre d'exemple, et lorsque le polymère de remplissage est un alginate, l'agent de gélification est de préférence choisi par les ions multivalents tels que des ions calcium.

La quantité d'agent de gélification variera également en fonction de la quantité de polymère de remplissage à l'état liquide que l'on souhaite gélifier et également en fonction de la dureté du gel que l'on souhaite obtenir.

Cette quantité d'agent de gélification est de préférence comprise entre 10 % et 80 % en poids par rapport au poids du polymère de remplissage à gélifier.

Les étapes d'imprégnation peuvent éventuellement être réalisées sous agitation, à une vitesse d'agitation de préférence comprise entre 150 et 2000 tours par minute.

Il est également possible de procéder à une sonication des solutions pendant les étapes d'imprégnation.

D'autre part, il est possible d'ajouter un ou plusieurs agents tensioactifs dans les solutions aqueuses (a) et/ou (b), ainsi que dans la composition (C) afin d'augmenter la mouillabilité du polymère poreux hydrophile ou amphiphile et ainsi faciliter l'imprégnation de celui-ci par le polymère de remplissage. Ces agents tensioactifs peuvent être choisis parmi les tensioactifs anioniques, cationiques, non-ioniques et amphotères, les tensioactifs non-ioniques étant particulièrement préférés.

La température à laquelle sont réalisées les opérations d'imprégnation varie en général de 20 °C à 90 °C environ.

La durée de chacune des opérations d'imprégnation est variable et est de préférence comprise entre 1 minute et 24 heures environ.

Plus particulièrement, l'étape a) est de préférence conduite pendant une durée comprise entre 1 et 24 heures ; l'étape b) est de préférence conduite pendant

une durée comprise entre 2 et 24 heures et l'étape c), lorsqu'elle est effectuée séparément des étapes a) et b) est de préférence conduite pendant une durée comprise entre 12 et 48 heures.

Entre chaque étape d'imprégnation, le réseau support peut 5 éventuellement être rincé, de préférence à l'eau.

Lorsque la préparation du biomatériau est terminée, celui est récupéré et séché selon des techniques classiques de séparation et de séchage (filtration, tamisage, etc ; séchage à l'air éventuellement sur lit fluidisé, lyophilisation, rayonnement infra-rouge, etc).

10 Le biomatériau chargé ou non en actifs biologiques et/ou chimiques ainsi obtenu peut se présenter sous diverses formes correspondant à la forme du polymère poreux hydrophile ou amphiphile de départ (billes, microsphères, feuilles, tiges, films, etc.....) et être utilisé, notamment dans le domaine biomédical, à titre d'implant (biomatériau non chargé en actif) ou de dispositif pour la libération 15 contrôlée d'au moins un actif biologique et/ou chimique.

A titre d'exemple, ce biomatériau peut notamment être utilisé pour la fabrication de dispositifs de vaccination, d'embolisation, de reconstruction tissulaire, d'implants bioactifs, etc.

Il peut également être utilisé pour la fabrication de dispositifs 20 médicaux ou de compositions, notamment de compositions pharmaceutiques, cosmétiques, dermatologiques, diététiques ou vétérinaires.

En particulier, le biomatériau conforme à l'invention peut avantageusement être utilisé pour la préparation de solutions injectables pour l'implantation intra-tissulaire ou intra-vasculaire.

25 La présente invention a donc également pour objet une solution injectable pour l'implantation intra-tissulaire ou intra-vasculaire, caractérisée en ce qu'elle renferme au moins un biomatériau tel que défini précédemment.

Lorsque ledit biomatériau se présente sous forme de microsphères, il 30 peut en particulier être utilisé pour la préparation de solution injectable pour la réalisation d'embolisations.

De préférence, cette solution injectable renferme des microsphères poreuses constituées de copolymères acryliques modifiés ou non par des groupements

fonctionnels ionisés ou ionisables choisis parmi les groupements (C₁-C₄)alkylamino et (C₁-C₄)alkylamino(C₁-C₄)alkyle tel que diéthylaminoéthyle, les pores de ladite microsphère étant remplis d'un gel d'alginate poreux (microsphères d'embolisation) dont les pores renferment éventuellement au moins un actif biologique et/ou chimique.

5 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à deux exemples de préparation de biomatériaux conformes à l'invention, et à une étude comparative de la cinétique de libération d'un actif (indométacine).

10 Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION DE BIOMATERIAUX POREUX RENFERMANT UN RÉSEAU DE REMPLISSAGE POREUX

15 Des microsphères acryliques vendues sous la dénomination DEAE-TRISACRYL ® par la société Biosepra ont été rincées à l'eau distillée puis essorées par filtration de la solution de microsphères sur un filtre nylon de 80 µm à l'aide d'une pompe à vide.

Les microsphères ainsi essorées ont ensuite été traitées suivant les conditions figurant dans le Tableau I ci-après.

20 De manière générale, 1 g de microsphères, éventuellement préalablement séchées sous rayonnement infra-rouge à 100°C pendant 10 mn, ont été mises à tremper dans une première solution d'alginate (MANUGEL ® DMB, MANUGEL ® DJX ou KELTONE ® HVCR) de concentration initiale en alginate [C1], pendant 1 heure, avec ou sans agitation ou sonication. Les microsphères ont 25 ensuite été mises à tremper dans une seconde solution du même alginate de concentration finale en alginate [C2] pendant 24 heures sans agitation.

Les microsphères ont ensuite été essorées comme précédemment puis redispersées dans de l'eau sous agitation à 600 tours par minute, puis une solution d'ions calcium a été ajoutée. L'ensemble a subi une agitation flash pendant quelques 30 secondes puis a été maintenu sous agitation à 200 tours par minute pendant 1h30.

On a obtenu des microsphères de DEAE-TRISACRYL ® remplies d'un réseau de remplissage poreux gélifié (Microsphères A à K du Tableau I ci-après).

TABLEAU I

Microsphères	Séchage aux IR avant imprégnation	Type d'alginate	Concentration [C1] initiale en alginate (%)	Concentration [C2] finale en alginate (%)	Concentration en ions calcium (g/l)	Remarques
A	Non	MANUGEL ® DMB	0,1	2	5	
B	Non	KELTONE ® HVCR	0,1	2	5	Pas d'agitation
C	Oui	KELTONE ® HVCR	0,05	1	2,5	
D	Oui	MANUGEL ® DIX	0,5	0,5	3	Sonication
E	Oui	MANUGEL ® DJX	0,5	0,5	5	Agitation mécanique à 200 tours / minute
F	Oui	MANUGEL ® DJX	1	1	25	
G	Oui	MANUGEL ® DJX	1	1	10	
H	Non	MANUGEL ® DMB	0,01	0,1	0,5	Pas d'agitation
I	Oui	MANUGEL ® DJX	0,3	0,75	3	Sonication
J	Oui	MANUGEL ® DJX	0,5	0,5	3	
K	Oui	MANUGEL ® DJX	0,01	1,31/3	50	Pas d'agitation

EXEMPLE 2 : PRÉPARATION DE BIOMATERIAUX CHARGÉS EN INDOMÉTACINE

Les microsphères A à K obtenues ci-dessus à l'exemple 1 ont ensuite été imprégnées par immersion dans une solution d'indométacine à 5 g/l pendant 12 à 5 48 heures, pour obtenir des microsphères chargées en indométacine.

EXEMPLE 3 : ÉTUDE COMPARATIVE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DE L'INDOMÉTACINE

Les microsphères H, I, J et K conformes à l'invention, chargées en indométacine et telles que préparées ci-dessus à l'exemple 2 ont été utilisées dans cette 10 étude, ainsi que des microsphères de DEAE-TRISACRYL ® M ayant simplement subi une étape d'imprégnation dans une solution d'indométacine à 5 g/l, dans les conditions décrites ci-dessus à l'exemple 2 (microsphères témoins : MT).

Les microsphères témoins se différencient des microsphères conformes à l'invention par le fait que l'indométacine est directement contenu dans les 15 pores du réseau support au lieu d'être contenu dans les pores du réseau de remplissage (gel d'alginate).

La cinétique de libération de l'indométacine a été étudiée et comparée pour chacune de ces microsphères. Ce test a été effectué selon les normes de la Pharmacopée Européenne III^{ème} édition (test de dissolution dans un appareil à 20 palettes tournantes), dans des conditions telles que l'indométacine libérée en solution n'empêche pas la libération de l'indométacine encore contenue dans les microsphères.

Pour ce faire, 1 g de microsphères a été mis en suspension dans 800 ml d'une solution physiologique de NaCl à 0,9% sous agitation. Des prélèvements ont été effectués à intervalles réguliers, afin de réaliser un dosage par spectrophotométrie 25 UV de l'indométacine libérée.

Les résultats obtenus figurent dans le Tableau II ci-après, la quantité d'indométacine libérée étant exprimée en pourcentage de la quantité totale d'indométacine contenue à t_0 dans la microsphère :

TABLEAU II

Temps (mn)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	t 50%
H (%)	0	31	42	52	61	67	71	75	78	88	2'48
I (%)	0	35	34	38	43	58	59	58	59	99	4'30
J (%)	0	20	29	36	45	53	57	61	61	94	4'36
K (%)	0	14	28	43	51	58	64	68	71	100	3'48
MT (%)	0	39	57	66	74	79	81	84	86	95	1'36

Ces résultats montrent que les microsphères H à K conformes à l'invention permettent de retarder la libération d'indométacine par rapport aux 5 microsphères témoin. D'autre part, ces résultats montrent qu'en faisant varier les conditions opératoires de préparation de ces microsphères (nature et concentration de l'alginate, concentration en ions calcium) on peut faire varier la cinétique de libération de l'indométacine et ainsi contrôler sa libération.

REVENDICATIONS

1. Biomatériau poreux caractérisé en ce qu'il est constitué d'un réseau polymère poreux hydrophile ou amphiphile (réseau support) dont les pores 5 renferment un réseau polymère poreux gélifié (réseau de remplissage), et dans lequel le diamètre des pores du réseau support est supérieur au diamètre des pores du réseau de remplissage.
2. Biomatériau selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la dureté du réseau support est supérieure à la dureté du réseau de remplissage.
- 10 3. Biomatériau selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que le réseau support est constitué par un ou plusieurs polymères résorbables ou non résorbables.
4. Biomatériau selon la revendication 3, caractérisé par le fait que les polymères utilisables à titre de réseau support sont choisis parmi les polyepsilons 15 caprolactones, les polymères et copolymères d'acide lactique et glycolique, l'albumine, la caséine, les gélatines réticulées, les polyanhydrides, les esters et éthers de cellulose, les polymères acryliques et méthacryliques, les polyacrylamides substitués ou non, les poly (alcools vinyliques) et les polyuréthanes
5. Biomatériau selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les 20 polymères acryliques sont choisis parmi ceux formés de copolymères acryliques modifiés ou non par des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables choisis parmi les groupements $(C_1-C_4)alkylamino$ et $(C_1-C_4)alkylamino(C_1-C_4)alkyle$.
6. Biomatériau selon la revendication 5, caractérisé par le fait que les groupements fonctionnels sont des groupements diéthylaminoéthyles.
- 25 7. Biomatériau selon la revendication 6, caractérisé par le fait que ledit réseau support se présente sous la forme d'une microsphère poreuse formée de copolymères acryliques modifiés par des groupements diéthylaminoéthyles.
8. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le réseau de remplissage est constitué par un ou 30 plusieurs polymères résorbables ou non résorbables.
9. Biomatériau selon la revendication 8, caractérisé par le fait que les polymères utilisables à titre de réseau de remplissage sont choisis parmi les alginates,

les pectines, l'acide hyaluronique, les carraghénanes, l'agarose, les agaropectines, les amyloses, les amylopectines, les arabino-galactanes, la cellulose et ses dérivés, le chitosane, la gomme adragante, la gomme arabique, la gomme de guar, les xanthanes, les dextrans, le collagène et les gélatines.

5 10. Biomatériaux selon la revendication 9, caractérisé par le fait que le réseau de remplissage est un gel d'alginate comprenant de 30 % à 75 % d'unités acide α -L-guluronique.

10 11. Biomatériaux selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le réseau de remplissage renferme au moins un actif biologique et/ou chimique.

15 12. Biomatériaux selon la revendication 11, caractérisé par le fait que l'actif biologique et/ou chimique est choisi parmi les agents anti-inflammatoires, les agents angiogéniques, les anti-mitotiques, les inhibiteurs de l'angiogénèse, les facteurs de croissance, les vitamines, les hormones, les protéines, les vaccins, les peptides, les antiseptiques, les antimicrobiens tels que les antibiotiques.

13. Biomatériaux selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il se présente sous la forme de film, de bloc, de feuille, de tige, de fil ou de particules telles que des microsphères.

20 14. Biomatériaux poreux caractérisé par le fait qu'il est constitué d'une microsphère poreuse constituée de copolymères acryliques modifiés ou non par des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables choisis parmi les groupements (C_1 - C_4)alkylamino et (C_1 - C_4)alkylamino(C_1 - C_4)alkyle, les pores de ladite microsphère étant remplis d'un gel d'alginate poreux dont les pores renferment au moins un actif biologique et/ou chimique.

25 15. Procédé de préparation d'un biomatériaux tel que défini à l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) l'imprégnation d'au moins un polymère poreux hydrophile ou amphiphile (réseau support) par une solution aqueuse (A) d'au moins un polymère de remplissage à l'état liquide,

b) l'imprégnation dudit polymère poreux hydrophile ou amphiphile par une solution aqueuse (B) d'au moins un agent apte à faire passer ledit polymère de remplissage de l'état liquide à l'état gélifié, et éventuellement

5 c) l'imprégnation dudit polymère poreux hydrophile ou amphiphile par une composition (C) contenant au moins un actif biologique et/ou chimique, ladite imprégnation pouvant être effectuée de façon concomitante aux étapes a) et b) par addition de la composition (C) dans l'une et/ou l'autre des solutions (A) et (B) ou de façon séparée après les étapes a) et b).

10 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que le réseau support est, dans une première étape, imprégné au moyen de la solution (A), puis dans une deuxième étape, par la solution (B), la composition (C) étant ajoutée à la solution (A) et/ou (B).

15 17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé par le fait que la concentration en polymère de remplissage dans la solution (A) varie de préférence de 0,01 à 2 % en poids par rapport au poids total de la solution (A).

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisé par le fait que le polymère de remplissage à l'état liquide est un alginat et que l'agent apte à faire passer ledit polymère de remplissage d'un état liquide à un état gélifié est choisi parmi les ions multivalents, de préférence les ions calcium.

20 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé par le fait que les solutions aqueuses (a) et/ou (b) et/ou la composition (C) renferment au moins un agent tensioactif.

25 20. Utilisation d'un biomatériau tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 14 à titre d'implant ou de dispositif pour la libération contrôlée d'au moins un actif biologique et/ou chimique.

21. Dispositif pour la libération contrôlée d'au moins un actif biologique et/ou chimique, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins un biomatériau tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 14.

30 22. Composition caractérisée par le fait qu'elle renferme au moins un biomatériau tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 14.

23. Solution injectable pour l'implantation intra-tissulaire ou intra-vasculaire caractérisée par le fait qu'elle renferme au moins un biomatériau tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 14.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	Application No
PCT/EP	01/03623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	A61L27/34	A61L27/14	A61L27/56	A61L27/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 110 484 A (SIERRA DAVID H) 29 August 2000 (2000-08-29) the whole document ---	1-4, 8, 9, 11-13, 15, 16, 20-22
A	WO 96 10374 A (OTOCORP ; SIERRA DAVID H (US)) 11 April 1996 (1996-04-11) page 6 -page 10 claims ---	1-22
A	US 5 635 215 A (LAURENT ALEXANDRE ET AL) 3 June 1997 (1997-06-03) cited in the application the whole document ---	1-22 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2002

Date of mailing of the international search report

15/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Böhm, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l	Application No
PC/IRK	01/03623

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 16687 A (UNIV TEXAS) 2 September 1993 (1993-09-02) abstract page 6 -page 8 page 15, paragraph 2 -page 19, paragraph 4 ---	1, 3-9, 11-13, 15, 20-22
A	WO 95 28964 A (LOHMANN THERAPIE SYST LTS ; ROREGER MICHAEL (DE)) 2 November 1995 (1995-11-02) page 12, paragraph 2 page 13, paragraph 2 page 15, paragraph 2 page 18, paragraph 4 -page 19, paragraph 1 page 21, paragraph 2 claim 15 ---	1, 3, 4, 8, 11-13, 15, 20-22
X, P	EP 1 103 277 A (ASHMAN ARTHUR) 30 May 2001 (2001-05-30) column 3, line 12-26 column 4, line 4-22, 54-58 column 5, line 28-38, 50-55 -----	1, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/EP	01/03623

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 6110484	A	29-08-2000	US	6277394 B1		21-08-2001
WO 9610374	A	11-04-1996	WO	9610374 A1		11-04-1996
			AU	1287895 A		26-04-1996
			AU	3763195 A		26-04-1996
			CA	2201526 A1		11-04-1996
			EP	0784490 A1		23-07-1997
			JP	10506811 T		07-07-1998
			WO	9610428 A1		11-04-1996
US 5635215	A	03-06-1997	FR	2676927 A1		04-12-1992
			AT	151284 T		15-04-1997
			AU	661319 B2		20-07-1995
			AU	2016892 A		08-01-1993
			CA	2110290 A1		10-12-1992
			DE	69218938 D1		15-05-1997
			DE	69218938 T2		31-07-1997
			DK	588875 T3		28-04-1997
			EP	0588875 A1		30-03-1994
			ES	2099827 T3		01-06-1997
			JP	6508139 T		14-09-1994
			WO	9221327 A1		10-12-1992
			US	5648100 A		15-07-1997
WO 9316687	A	02-09-1993	US	5529914 A		25-06-1996
			AT	197125 T		15-11-2000
			AU	673160 B2		31-10-1996
			AU	3735393 A		05-10-1993
			AU	683209 B2		06-11-1997
			AU	3780993 A		13-09-1993
			BR	9306038 A		13-01-1998
			BR	9306041 A		18-11-1997
			CA	2117584 A1		02-09-1993
			CA	2117588 A1		16-09-1993
			DE	69329594 D1		30-11-2000
			DE	69329594 T2		31-05-2001
			DK	627911 T3		20-11-2000
			EP	0627911 A1		14-12-1994
			EP	0627912 A1		14-12-1994
			ES	2153378 T3		01-03-2001
			JP	3011767 B2		21-02-2000
			JP	7506961 T		03-08-1995
			JP	3011768 B2		21-02-2000
			JP	7507056 T		03-08-1995
			KR	266912 B1		01-12-2000
			NZ	249770 A		25-09-1996
			NZ	251039 A		26-03-1996
			PT	627911 T		30-04-2001
			US	5410016 A		25-04-1995
			WO	9317669 A1		16-09-1993
			WO	9316687 A1		02-09-1993
			US	6060582 A		09-05-2000
			US	5468505 A		21-11-1995
			US	5626863 A		06-05-1997
			US	5843743 A		01-12-1998
			US	5567435 A		22-10-1996
			US	5801033 A		01-09-1998
			US	6306922 B1		23-10-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/RK	01/03623

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9316687	A		US 5986043 A		16-11-1999
			US 6258870 B1		10-07-2001
			US 5573934 A		12-11-1996
			US 5858746 A		12-01-1999
			US 5834274 A		10-11-1998

WO 9528964	A	02-11-1995	DE 4414755 A1		11-01-1996
			AT 180409 T		15-06-1999
			AU 695621 B2		20-08-1998
			AU 2307895 A		16-11-1995
			CA 2188464 A1		02-11-1995
			CZ 9603108 A3		11-06-1997
			DE 59506057 D1		01-07-1999
			DK 804245 T3		29-11-1999
			WO 9528964 A1		02-11-1995
			EP 0804245 A1		05-11-1997
			ES 2134468 T3		01-10-1999
			FI 964253 A		22-10-1996
			GR 3030955 T3		30-11-1999
			HU 75468 A2		28-05-1997
			IL 113326 A		31-01-2000
			JP 9512257 T		09-12-1997
			NO 964539 A		18-12-1996
			NZ 284476 A		26-08-1998
			PL 316659 A1		03-02-1997
			SI 804245 T1		31-10-1999
			SK 138096 A3		06-08-1997
			ZA 9503410 A		09-04-1996

EP 1103277	A	30-05-2001	EP 1103277 A1		30-05-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem - rnative No
PCI/PK 01/03623

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61L27/34 A61L27/14 A61L27/56 A61L27/54

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 110 484 A (SIERRA DAVID H) 29 août 2000 (2000-08-29) le document en entier ---	1-4, 8, 9, 11-13, 15, 16, 20-22
A	WO 96 10374 A (OTOCORP ; SIERRA DAVID H (US)) 11 avril 1996 (1996-04-11) page 6 -page 10 revendications ---	1-22
A	US 5 635 215 A (LAURENT ALEXANDRE ET AL) 3 juin 1997 (1997-06-03) cité dans la demande le document en entier ---	1-22
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spécifique (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 février 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/02/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Böhm, I

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/03623

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 16687 A (UNIV TEXAS) 2 septembre 1993 (1993-09-02) abrégé page 6 -page 8 page 15, alinéa 2 -page 19, alinéa 4 ---	1, 3-9, 11-13, 15, 20-22
A	WO 95 28964 A (LOHMANN THERAPIE SYST LTS ; ROREGER MICHAEL (DE)) 2 novembre 1995 (1995-11-02) page 12, alinéa 2 page 13, alinéa 2 page 15, alinéa 2 page 18, alinéa 4 -page 19, alinéa 1 page 21, alinéa 2 revendication 15 ---	1, 3, 4, 8, 11-13, 15, 20-22
X, P	EP 1 103 277 A (ASHMAN ARTHUR) 30 mai 2001 (2001-05-30) colonne 3, ligne 12-26 colonne 4, ligne 4-22, 54-58 colonne 5, ligne 28-38, 50-55 -----	1, 3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale N°
 PCT/FR 01/03623

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 6110484	A	29-08-2000	US	6277394 B1		21-08-2001
WO 9610374	A	11-04-1996	WO	9610374 A1		11-04-1996
			AU	1287895 A		26-04-1996
			AU	3763195 A		26-04-1996
			CA	2201526 A1		11-04-1996
			EP	0784490 A1		23-07-1997
			JP	10506811 T		07-07-1998
			WO	9610428 A1		11-04-1996
US 5635215	A	03-06-1997	FR	2676927 A1		04-12-1992
			AT	151284 T		15-04-1997
			AU	661319 B2		20-07-1995
			AU	2016892 A		08-01-1993
			CA	2110290 A1		10-12-1992
			DE	69218938 D1		15-05-1997
			DE	69218938 T2		31-07-1997
			DK	588875 T3		28-04-1997
			EP	0588875 A1		30-03-1994
			ES	2099827 T3		01-06-1997
			JP	6508139 T		14-09-1994
			WO	9221327 A1		10-12-1992
			US	5648100 A		15-07-1997
WO 9316687	A	02-09-1993	US	5529914 A		25-06-1996
			AT	197125 T		15-11-2000
			AU	673160 B2		31-10-1996
			AU	3735393 A		05-10-1993
			AU	683209 B2		06-11-1997
			AU	3780993 A		13-09-1993
			BR	9306038 A		13-01-1998
			BR	9306041 A		18-11-1997
			CA	2117584 A1		02-09-1993
			CA	2117588 A1		16-09-1993
			DE	69329594 D1		30-11-2000
			DE	69329594 T2		31-05-2001
			DK	627911 T3		20-11-2000
			EP	0627911 A1		14-12-1994
			EP	0627912 A1		14-12-1994
			ES	2153378 T3		01-03-2001
			JP	3011767 B2		21-02-2000
			JP	7506961 T		03-08-1995
			JP	3011768 B2		21-02-2000
			JP	7507056 T		03-08-1995
			KR	266912 B1		01-12-2000
			NZ	249770 A		25-09-1996
			NZ	251039 A		26-03-1996
			PT	627911 T		30-04-2001
			US	5410016 A		25-04-1995
			WO	9317669 A1		16-09-1993
			WO	9316687 A1		02-09-1993
			US	6060582 A		09-05-2000
			US	5468505 A		21-11-1995
			US	5626863 A		06-05-1997
			US	5843743 A		01-12-1998
			US	5567435 A		22-10-1996
			US	5801033 A		01-09-1998
			US	6306922 B1		23-10-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der internationale No
PC., . . . 01/03623

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9316687	A	US 5986043 A US 6258870 B1 US 5573934 A US 5858746 A US 5834274 A	16-11-1999 10-07-2001 12-11-1996 12-01-1999 10-11-1998
WO 9528964	A 02-11-1995	DE 4414755 A1 AT 180409 T AU 695621 B2 AU 2307895 A CA 2188464 A1 CZ 9603108 A3 DE 59506057 D1 DK 804245 T3 WO 9528964 A1 EP 0804245 A1 ES 2134468 T3 FI 964253 A GR 3030955 T3 HU 75468 A2 IL 113326 A JP 9512257 T NO 964539 A NZ 284476 A PL 316659 A1 SI 804245 T1 SK 138096 A3 ZA 9503410 A	11-01-1996 15-06-1999 20-08-1998 16-11-1995 02-11-1995 11-06-1997 01-07-1999 29-11-1999 02-11-1995 05-11-1997 01-10-1999 22-10-1996 30-11-1999 28-05-1997 31-01-2000 09-12-1997 18-12-1996 26-08-1998 03-02-1997 31-10-1999 06-08-1997 09-04-1996
EP 1103277	A 30-05-2001	EP 1103277 A1	30-05-2001